

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานทั้งสองแห่งเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้จากความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้ร่วมวิจัย 2 ท่านคือ อาจารย์นายแพทย์ ดร. ชวบูลย์ เศรษฐุม และ นางสาว พัทรี ปราศจาก ซึ่งหัวหน้าโครงการขอขอบคุณท่านทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังใคร่ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยส่วนรวม และ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ รวมทั้งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกต่างๆทั้ง น้ำ ไฟ สถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ ที่สำคัญที่สุดอีกประการหนึ่งที่ทำให้โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยดีคือการได้รับความร่วมมือเป็นอย่างดีจากคณะแพทย์และพยาบาลจากโรงพยาบาล ป.แพทย์ โรงพยาบาลเซนต์แมรีและโรงพยาบาลค่ายสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาใช้วิจัยในครั้งนี้ ซึ่งต้องขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ท้ ำ ย สุ ค นี ผู้ วิ จั ย

ขอขอบคุณคณะกรรมการประเมินงานวิจัยและบุคคลอื่นๆซึ่งไม่อาจกล่าวได้หมดในโอกาสนี้ สำหรับการสนับสนุนและความช่วยเหลือต่างๆซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผศ. ทนพญ. ดร. วิไลรัตน์ ลีอนันต์ศักดิ์ศิริ

หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลได้รับการยอมรับว่าสามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาโรคต่างๆ ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการรักษาโรคต่างๆ นี้มักพบกับปัญหาเรื่องการมีปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ในการรักษาโรค และคุณภาพที่ของเซลล์ซึ่งหากนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเป็นเวลานานเป็นเดือนเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณเพียงพอนั้น จะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้ ซึ่งเมื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคจะส่งผลให้การรักษาโรคในผู้ป่วยไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคิดค้นหาเทคโนโลยีใหม่ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลจากสายสะดือ ให้สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น และยังคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้น ในการนี้ได้มีการพัฒนาน้ำยาเลี้ยงเซลล์ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีผู้ใดศึกษา คือ embryonic stem cells conditioned medium (ESCM) ผสมรวมกับ epidermal growth factor (EGF) เป็นส่วนประกอบหลักอีกชนิดหนึ่ง และนำมาเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (ปริมาณออกซิเจน ร้อยละ 5) จากผลการทดลองพบว่าวิธีการนี้สามารถเร่งการเจริญเติบโตของ เซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอลจากสายสะดือได้เป็นอย่างดี โดยสามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้สูงถึง 424.88 ± 14.62 เท่าเมื่อเทียบกับจำนวนเริ่มต้น ภายในระยะเวลาเพียง 12 วัน ในขณะที่เดียวกันเซลล์เหล่านี้ยังสามารถรักษาคุณสมบัติของความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอล จากสายสะดือได้อย่างดีทั้งในด้านของรูปร่างเซลล์ การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ ($CD_{29}^{+} CD_{44}^{+} CD_{90}^{+} CD_{34}^{-} CD_{45}^{-}$) ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่จำเพาะ (เซลล์กระดูกแข็ง เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน) และการแสดงออกของยีนที่บ่งชี้ความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด การทดลองนี้สรุปได้ว่าการเลี้ยงเซลล์แบบใหม่นี้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดเมสเซนไคนีมอล จากสายสะดือได้อย่าง

มีประสิทธิภาพที่สูง ในระยะเวลาอันสั้น ซึ่งเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ในทางคลินิกเพื่อการรักษาโรคและเก็บแช่แข็งเป็นธนาคารเซลล์ต้นกำเนิดเพื่อใช้ในระยะยาวต่อไปได้

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) has been accepted as a promising tool for therapeutic purpose. However, insufficient quantity of the cells and changing in stem cell characteristics of the stem cells according to the long term cell culture *in vitro* (more than 30 days) are major obstacles for therapeutic applications of this cell type. These problems lead to ineffective therapeutic outcomes. Therefore, this work focus on development a new effective method for Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSCs) expansion *in vitro* in a short period of time which is also able to maintain its stem cell characteristics. To this end, we developed a new culture medium composes of embryonic stem cell condition media containing epidermal growth factor as another major component of the media. We used this medium to culture WJ-MSCs under hypoxic condition (5% O₂). The results demonstrated that this new medium could accelerate WJ-MSCs expansion by 424.88 ± 14.62 folds increase in day 12 compared to day 0 of the *in vitro* cultures. The expanded cells also could preserve common characteristics of MSCs including cells morphology, cell surface marker expressions (CD₂₉⁺, CD₄₄⁺, CD₉₀⁺, CD₃₄⁻, CD₄₅⁻), differentiation potential (osteoblasts, chondroblasts, adipocytes), and stemness marker expressions. Altogether, this new method can serve as a new high effective method for WJ-MSCs expansion *in vitro* in a short period of time which suitable for clinical applications and stem cell bank for long term use of the cells.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพที่	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
ข้อตกลงเบื้องต้น	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
วิธีการทดลองเก็บข้อมูล	7
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	12
บทที่ 3 ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการวิจัยและผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	14
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์	22
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	26
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 รายการแสดงชื่อและ sequences ของ primers	10

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 รูปร่างลักษณะของ WJ-MSCs	14
ภาพที่ 2 อัตราการเจริญเติบโต และอัตราการเพิ่มจำนวนของ WJ-MSCs	15
ภาพที่ 3 ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัว (PDT)	16
ภาพที่ 4 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs ในช่วงปลาย (P7) ..	17
ภาพที่ 5 การแสดงออกของโปรตีนบนผิวเซลล์ของ WJ-MSCs	19
ภาพที่ 6 ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ adipocytes, chondroblast และ osteoblast	20
ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเป็น stem cells ของ WJ-MSCs ..	21

คำอธิบายสัญลักษณ์

AFP	=	alpha-fetoprotein
ALB	=	albumin
bFGF	=	basic fibroblast growth factor
BM	=	bone marrow
BSA	=	bovine serum albumin
° C	=	degree Celsius
cDNA	=	complementary DNA
CK-18	=	cytokeratin 18
CO ₂	=	carbon dioxide
D	=	day
DAPI	=	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	=	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	=	epidermal growth factor
ES	=	embryonic stem cells
ESCM	=	embryonic stem cells conditioned medium
FBS	=	fetal bovine serum

คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

g	=	gram
h	=	hour
HDGF	=	hepatoma-derived growth factor
HepG2	=	hepatocellular carcinoma cell line
HGF	=	hepatocyte growth factor
ITS	=	insulin, transferrin and selenium
LDL	=	low-density lipoprotein
mRNA	=	messenger RNA
MSCs	=	mesenchymal stem cells
NH ₄ Cl	=	ammonium chloride
O ₂	=	oxygen
OSM	=	oncostatin M
PBS	=	phosphate buffer saline
PDT	=	population doubling time
RNA	=	ribonucleic acid
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
WJ-MSCs	=	Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells